

Saiyed Iqbal Ahmed Ibrahimi

DAS TYPEN-SPEKTRUM DER SPONTANEN
UND HITZEINDUZIERTEN
AUXOTROPHIE - MUTATIONEN
BEI DEN BAKTERIEN
SERRATIA MARCESCENS CV/rc₃
UND E. COLI "HARVARD"

Frankfurt am Main 1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546708_0054

DAS TYPEN-SPEKTRUM DER SPONTANEN UND HITZE-
INDUZIERTEN AUXOTROPHIE-MUTATIONEN BEI DEN
BAKTERIEN SERRATIA MARCESCENS CV/rc₃ UND
E.COLI "HARVARD".

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main,

vorgelegt von
Saiyed Iqbal Ahmed Ibrahimi

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Frankfurt am Main.

Dekan: Prof.Dr.Th.Wieland

1.Berichterstatter:Prof.Dr.R.W.Kaplan

2.Berichterstatter:Prof.Dr.Hoffmann-
Berling.

Tag der mündlichen Prüfung:26.Juli,1963.

Meinen Eltern gewidmet!

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<u>I. Einleitung</u>	1 - 11
<u>II. Material und Methodik:</u>	
A). Bakterienstämme.	12
B). Medien usw.	12
C). Auxanographie	12-16
D). Gewinnung der spontanen Auxotrophen von Serratia CV/rc ₃ u. Bestimmung ihres Wuchs- stoffbedarfes	17-18
E). Hitzeinduzierte Auxotrophe von Serratia CV/rc ₃ .	18-19
F). Spontane Auxotrophe von E.coli "Harvard".	19
G). Hitzeinduzierte Mutanten von E.coli "Harvard".	19-20
<u>III. Experimentelle Ergebnisse:</u>	
A). Das Spektrum der spontanen Auxotrophie- Mutanten bei Serratia CV/rc ₃ .	21-22
B). Hitzeinaktivierung von Serratia CV/rc ₃ u. das Spektrum der hitzeinduzierten Auxotrophie-Mutanten.	22-23
C). Das Spektrum der spontanen Auxotrophie- Mutanten bei E.coli "Harvard"	24
D). Hitzeinaktivierung von E.coli "Harvard" und die Induktion von Auxotrophen.	24
E). Vergleich des spontanen Auxotrophie- Mutanten-Spektrums von Serratia CV/rc ₃ mit dem hitzeinduzierten und dem spontanen Spektrum von E.coli "Harvard".	25-26
F). Statistische Berechnungen zur Sicherung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Auxotrophie-Mutanten-Spektren	27-33

<u>IV. Diskussion</u>	Seite 34-41
<u>V. Zusammenfassung.</u>	42
<u>VI. Literaturverzeichnis.</u>	44-51
<u>VII. Lebenslauf.</u>	52

Tabellen: I= S. 25-26; II= S. 28-29; III= S.31-33.

Abbildungen: 1 =S. 22a, 2= S. 24a , 3= S. 26a.

I. Einleitung

Mutationen sind Veränderungen in der Erbsubstanz. Diese Substanz besteht in allen Zellen und in den meisten Viren hauptsächlich aus DNS. Verschiedene Arten von physikalischen und chemischen Studien wurden in Vivo und in Vitro unternommen, um den Veränderungsmechanismus zu klären, dem die Erbsubstanz unterliegt, wenn eine Mutation stattfindet. Es ist heute fast sicher, daß die Mutation im Gen verursacht wird durch den Austausch eines Basenpaares oder von Gruppen von Basenpaaren, was dann in einer veränderten Nukleotidsequenz resultiert.

Mutationen entstehen spontan oder sie können auch induziert werden. Agenzien für die Induktion von Mutationen sind: Ionisierende und UV-Strahlen, chemische Substanzen, Hitze usw. Die Erkenntnisse, die man an solchen induzierten Mutanten gewonnen hat, können u.U. beitragen zur Klärung des Auftretens von spontanen Mutanten. Aus diesem Grunde sollen zunächst einige Betrachtungen über chemisch induzierte und hitze-induzierte Mutationen gemacht werden.

Chemisch induzierte Mutationen: FREESE et al versuchten in ihrer Arbeit über Induktion von Mutationen in Bakteriophagen T_4 den Mechanismus chemischer Mutagenität präziser zu klären. In ihren Experimenten benutzten sie zwei Gruppen von Chemikalien. Die einen verursachen die Veränderungen in der extrazellulären Phagen-DNS und die anderen werden während der Periode der intrazellulären Vermehrung der Phagen in ihre DNS inkorporiert. Nitrit, Hydroxylamin und Diäthylsulfat gehören zu der ersten Gruppe von Chemikalien, während 5-Bromuracil, 2-Aminopurin, Acridin und Deuterium-Oxyd zu der zweiten Gruppe gehören. FREESE unterscheidet zwei Arten von Veränderungen: Fehler bei der Inkorporation oder bei der Replikation ("Copy-error"),

was er durch Versuche mit BU zeigen konnte. Aus den Resultaten von Rückmutationstesten an T_4 mit den oben genannten Chemikalien schließt FREESE auf zwei Basenänderungsmechanismen: 1. Transition, d.h. Ersatz eines Purins durch ein anderes Purin oder eines Pyrimidins durch ein anderes Pyrimidin, und 2. Transversion, d.h. Ersatz eines Purins durch ein Pyrimidin oder umgekehrt. So verursacht z.B. 5-BU und 2-AP Transitionen, während Acridin für Transversionen verantwortlich ist. Andererseits könnten Diäthylsulfat, erhöhte Temperatur bei niedrigen pH und die "Agenzien" spontaner Mutationen sowohl Transitionen als auch Transversionen verursachen. FREESE folgerte außerdem, daß die meisten rückmutierten Punktmutationen im Phagen T_4 dem Austausch eines einzigen Nukleotid-Paares in der DNS entsprechen.

Die alkylierenden Agenzien wurden ebenfalls mutagen befunden. LOVELESS stellte fest, daß Äthylmethansulfonat Mutationen bei Phagen in vitro erzeugt. Es gibt aber noch andere chemische Substanzen, z.B. Peroxyde, deren direkte Wirkung auf die DNS noch nicht erwiesen ist. Es ist durch viele Experimente gezeigt worden, daß eine Analogie besteht zwischen dem mutagenen Wirkungsmechanismus der UV-Strahlen und dem verschiedener Chemikalien. Beide veranlassen, daß die Zellen durch prämutative Stadien gehen, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zur Perfektion der Mutation führen können.

Hitzeinduzierte Mutationen: Untersuchungen über das Auftreten von Mutanten nach Hitzeeinfluß ist an verschiedenen Organismen untersucht worden. So ist z.B. berichtet worden (S. ZAMENHOF, S. GREER; 1958), daß geringe Hitze (bis zu 36°C) bei Drosophila und einigen Bakterien-Stämmen nur eine kleine Erhöhung der spontanen Mutationsrate verursacht.

Andererseits wurde aber auch beobachtet, daß z.B. nach Erhitzung von Mutanten von *E. coli* 15 und *E. coli* W₆ in wäßriger Suspension bei 55°C und bei 60°C ein hoher Anteil von verschiedenen Mutanten (einschließlich Auxotrophe) unter den Überlebenden auftrat (ZAMENHOF et al, 1958). Rekonstruktions-Experimente zeigten, daß die Mutanten tatsächlich durch die Hitzebehandlung erzeugt und nicht nur durch sie selektioniert wurden. Rekombinations-Experimente zeigten dann, daß hitzeinduzierte Mutanten im allgemeinen segregieren und nur manchmal cytoplasmisch sind. Das zeigt, daß die Hitze tatsächlich in der DNS erhebliche Änderungen herbeiführen kann. Noch klarer wird das durch den Befund, daß Hitze (Temperatur = 60°C) in vitro eine Instabilität von transformierender DNS hervorrufen kann (ZAMENHOF, 1958).

Der Befund, daß sektorierte Kolonien, zum Teil aus lac⁻, zum Teil aus lac⁺-Zellen bestehend, nach der Hitzebehandlung entstehen, zeigt an, daß der Mutationsschaden nur einem Strang eines DNS-Moleküls und/oder nur einem Nukleus einer multinuklearen Zelle zugefügt worden ist, oder aber, daß die Mutation erst nach der ersten Zellteilung fertiggestellt wurde (ZAMENHOF 1960, 1961). Auch wurde gezeigt, daß geringere Hitzebehandlung (45°C) bei pH 5 Induktion vom Mutanten im Bakteriophagen T₄ ergibt (E. FREESE und E. BAUTZ-FREESE; 1959).

Bei der Behandlung von Mikroorganismen in wäßriger Suspension ist das Verhältnis zwischen lethalen und mutagenen Ereignissen verhältnismäßig groß. Um aber an der DNS eine häufigere genetische Veränderung vorzunehmen, ohne einen zu großen Verlust in der Replikationsfähigkeit hervorzurufen, wurden von ZAMENHOF Untersuchungen gemacht, bei denen eine große Anzahl vegetativer Zellen von *E. coli* und Sporen von *B. subtilis* in getrocknetem Zustand im

Vakuum auf 135 bis 155°C für 16 Min. erhitzt. Es ergab sich, daß die vegetativen Zellen von *E. coli* unter diesen Bedingungen fast ebenso widerstandsfähig gegen Hitze waren wie die Sporen vom *B. subtilis*. Das könnte auf der wirksamen Entfernung von Wasser und O₂ beruhen, was in einer Verlangsamung der Denaturationsprozesse durch Hitze resultiert. Nach einer solchen Behandlung bekam man ungefähr 10% Mutanten, unter denen sich stabile und instabile (Pseudo-) Auxotrophie-Mutanten befanden. Das Phänomen der Pseudoauxotrophie (d.i. nicht-erbliche Unfähigkeit auf synthetischen Medium zu wachsen und verzögertes Wachstum auf Komplet-Medium zu zeigen) wurde bei erhitzten Zellen von *E. coli* beobachtet. Es könnte u.a. eine Folge von Denaturierung wichtiger Enzyme sein (ZAMENHOF, 1960).

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, welche Veränderungen an der DNS durch Hitzebehandlung entstehen, wurden die Bausteine der DNS einer ebensolchen Behandlung unterzogen. Es ist gezeigt worden, daß DNS und Deoxyadenosin, wenn man sie bei mittlerem pH erhitzt, einen meßbaren Basenverlust erleiden, der auf der Hydrolyse der N-glykosidischen Bindungen zurückzuführen ist. Desoxyadenosin, erhitzt auf 81°C bei einem pH von 6,8 ließ 4,5% Adenin frei. Bei Kalbsthymus-DNS, die der obengenannten Hitzebehandlung unterworfen wurde, wurden 0,9% Adenin und 1,4% Guanin freigesetzt. Das zeigt, daß allein der Verlust einer solchen Menge von Purinen gut verantwortlich sein könnte für den Verlust genetischer Information, und bereits bei geringfügiger Behandlung die genetische Information änderte (S. GREER, S. ZAMENHOF, 1959).

Weiterhin erforschten kürzlich GREER et al die Depurination von DNS und RNS, verursacht durch Hitze, in gelöstem und trockenem Zustand. Wenn DNS in gelöstem Zustand er-

hitzt wurde, wurden Purine freigesetzt. Pyrimidine, Desoxynukleotide, Desoxynukleoside, Desoxyribose, organische Phosphate, anorganische Phosphate, Xanthin oder Hypoxanthin konnten in Dialysaten so behandelter DNS nicht entdeckt werden. Der Grad der Depurinisierung ist nicht beeinflußt durch Inkorporation von 5-BU in die DNS. Es wurde auch gesichert, daß unter den meisten Erhitzungsbedingungen etwas mehr Guanin als Adenin freigesetzt wird. Selbst wenn anorganische Phosphate, organische Phosphate und Desoxyribose von der DNS gelöst wurden in Mengen, die durch die angewandten Methoden nicht feststellbar sind, so ist ihre Menge doch signifikant niedriger als die Freisetzung von Purinen.

Drei Mechanismen für die Depurinisierung sind möglich (alle drei können zugleich wirksam sein): 1. Zuerst wird die Purin-Base entfernt, worauf die Zerstörung des Zuckers und/oder die Freisetzung von anorganischem Phosphat folgen kann, aber nicht muß. 2. Zuerst wird die Desoxyribose zerstört, worauf die Freisetzung der Base und/oder des anorganischen Phosphates folgen kann oder nicht. 3. Zuerst kann das Phosphat abgelöst werden. Einer der Gründe für die hohe Mutabilität durch Hitze könnte sein, daß mehrere Möglichkeiten von Weitermutationen bestehen, wenn ein Purin entfernt wird: Das Purin kann ersetzt werden durch ein anderes Purin, weil bei der Replikation sich gegenüber der "apurinen Stelle" ein falsches Pyrimidin setzt, oder das Purin kann durch irgendein Pyrimidin ersetzt werden, weil sich gegenüber dieser Lücke irgendein Purin setzt.

Darüberhinaus können die Basen in der Nachbarschaft die zuletzt erwähnte Veränderung beeinflussen, und die Zerstörung des Zuckers kann auch weitere komplizierte Auswir-

kungen auf die Paarung von Basen haben. Die Freisetzung eines Purin-Moleküls aus der DNS von einem Molekulargewicht $6 \cdot 10^6$ entspricht ungefähr 0,02 mol% des betreffenden Purins, deswegen scheint es durchaus möglich, daß die Depurinisierung tatsächlich unter den Bedingungen der Erhitzung von Bakterien in Lösung stattfindet, die Mutation verursachen könnte. (S. GREER, S. ZAMENHOF; 1962)

Spontane Mutationen: Für die Entstehung spontaner Mutationen fehlt noch eine gesicherte Erklärung, jedoch sind mehrere Hypothesen zu dieser Frage gemacht worden:

1. Natürliche Strahlen:

TIMOFÉEFF-RESSOVSKY et al glaubten zuerst, daß die natürlichen Strahlen die Ursache der spontanen Mutationen sein könnten. In ihren späteren Versuchen stellten sie fest, daß die spontane Mutationsrate von Drosophila sich ganz unabhängig von der Intensität kosmischer Strahlung verhält. Dieses bedeutet also, daß die natürlichen Strahlungen nur einen geringen Anteil der spontanen Mutationsrate hervorrufen; denn die Dosis pro Generation ist in diesem Falle so gering, daß dadurch das verhältnismäßig häufige Auftreten von spontanen Mutationen gar nicht erklärt werden kann. Darum nehmen sie an, daß als Ursache der spontanen Mutationen in erster Linie etwas anderes in Frage kommen müsse. Analoge Schlüsse gelten für die Mikroorganismen mit ihren viel kürzeren Generationszeiten.

2. Molekulare Temperatur-Schwingungen:

TIMOFÉEFF-RESSOVSKY et al (1935) betrachteten als alternative Ursache für die spontanen Mutationen molekulare Wärmeschwingungen in der Erbsubstanz. Rein physikochemisch betrachtet, könnte dieses "statistische Vari-

ieren" der Schwingungsenergie innerhalb des Atomverbandes zur Veränderung bzw. Mutation führen.

3. Mutagene Metaboliten:

An der Harvard-Universität entdeckten GOLDSTEIN und SMOOT (1955), daß der stabile E. coli-Stamm, den sie lyophilisiert aufgehoben hatten, plötzlich sehr mutabel geworden war und eine höhere Rate der spontanen Mutationen (einschließlich Auxotrophie-Mutanten sehr verschiedenen Typs) zeigte. Diesen Stamm nannten sie "Harvard". Sie postulierten, daß in dem ursprünglichen E. coli-Stamm irgendeine Struktur im Genom so verändert worden sei, daß sie die Produktion irgendwelcher intermediärer Metaboliten anregt, die die Mutation sehr vieler Gene stark beeinflußt. Diese veränderte Struktur im Genom wird "Mutator-Gen" genannt. Als mögliche Alternative zu dieser "Metaboliten-Wirkung" nannten sie eine außergewöhnliche DNA-Se-Aktivität im "Harvard"-Stamm. Allerdings alle Versuche, solch ein Agens in zellfreiem Filtrat eines ein Mutator-Gen enthaltenden Stammes zu finden, waren vergeblich. Auch die Hitzeinaktivierung von DNS solch eines Stammes oder dessen Desoxyribonuklease Aktivität unterschied sich nicht von derjenigen des Elternstammes, der kein Mutator-Gen enthält (ZAMENHOF, GREER, De GIOVANNI, 1958).

Die Wirkung vom Mutatorgenen ist auch bei anderen Organismen z.B. Mais (B. McCLINTOCK, 1951), Drosophila (M. DE MEREZ, 1941), Streptomyces (H.B. NEWCOMBE, 1953) und Hefe (B. EPHRUSSI et al, 1951) beschrieben worden. Die Spezifität von Mutatorgenen kann unterschiedlich sein. So erhöht der Mutator-Locus in E. coli K 12 (TREFFERS et al, 1954) und in E. coli Harvard (GOLDSTEIN, 1955) die Mutationsraten einer größeren Anzahl von Genen. Im Gegensatz dazu gibt es andere Mutatorgene,

die nur bestimmte Gene beeinflussen (JYSSUM, 1960). In *Salm.typhimurium* wurde beobachtet (T. MIYAKE, 1960), daß das Mutator-Gen die spontane Mutabilität in verschiedenen Allelen desselben Locus in verschiedenem Grade erhöht. Das alles zeigte die "elektive" Wirkung des Mutator-Gens.

Die Versuche an Phagenresistenzmutationen von *E. coli* haben gezeigt, daß wenigstens ein Teil der spontanen Mutationen durch mutagene Metaboliten entstehen. Theophyllin, Coffein und andere Purine können die Rate der obengenannten Mutationen erhöhen. Adenosin und Guanosin wirken als Antimutagene in dem sie Theophyllin, Coffein und anderen Purinen zugesetzt, deren mutagene Wirkung aufheben. Auch die spontane Mutationsrate wird durch solche antimutagene Substanzen herabgesetzt. Dies deutet darauf hin, daß die im Stoffwechsel vorkommenden Purine zum Teil für die spontanen Mutationen verantwortlich sind (NOVICK, 1956).

4. Mutationen in ruhenden Zellen:

Eine vierte Theorie stammt von RYAN und Mitarbeitern. Sie bezieht sich jedoch nur auf ruhende Bakterien-Zellen: Obwohl in ruhenden Bakterien nur sehr wenig DNS repliziert wird, so findet man dort doch im Vergleich dazu eine relativ hohe Mutationsrate. Das könne dadurch erklärt werden, daß der Nukleotid-Pool stark verändert ist gegenüber demjenigen wachsender Zellen und daß es dadurch eher einmal zu einem Basenpaarungsfehler kommen kann (RYAN et al, 1959).

Daß durch die bisher noch unbekannten Ursachen der spontanen Mutationen an der DNS prämutative Veränderungen hervorgerufen werden, wurden z.B. in Versuchen mit getrockneten Sporen von *Neurospora crassa* angezeigt.

(AUERBACH, 1959) Ihre Ergebnisse werden so gedeutet, daß in der Kälte (bei 4°C) ein chemisches Mutagen entsteht, oder daß irgendwelche Bedingungen, die zur Mutation prädisponieren, eintreten und daß nur der letzte Schritt bei der Mutagenese den beobachteten hohen Temperaturkoeffizienten hat.

Die entstandenen spontanen Mutationen können sowohl Punktmutationen (Mutation in einem Nukleotidpaar) als auch Deletionen (Ausfälle längerer Stücke in einem oder mehreren Genen) sein. Darunter sind die Punktmutationen meist sehr viel häufiger als die Deletionen. Eine Ausnahme macht ein cys C Locus in *Salm.typhimurium*, wo 40% der spontanen Mutationen Deletionen sind (DEMEREK, 1960).

Die einzelnen mutablen Stellen auf einem Gen mutieren spontan nicht mit gleicher Häufigkeit. Vielmehr gibt es einige unter ihnen, die besonders häufig mutieren. Das entdeckte BENZER bei Kreuzungs-Experimenten, zur Lokalisation von rII-Mutanten im Phagen T₄. Er fand in der rII-Region zwei solcher Stellen, die er "hot-spots" nannte, eine davon im Cistron A und die andere im Cistron B. Der hot-spot im Cistron B enthielt fast 500 oder ungefähr 25% aller gefundenen spontanen Mutanten und der andere fast 300 oder 15%. Da eine genetisch identifizierbare Stelle im Gen wahrscheinlich einem Nukleotid-Paar der DNS entspricht, kann diese Instabilität nicht allein dem Nukleotid-Paar zugeschrieben werden, das sich im hot-spot befindet; denn sonst würde man öfter hot-spot finden müssen. Deshalb muß es die Umgebung der Stelle sein, die dessen Mutationshäufigkeit beeinflusst (BENZER, 1961).

Auxotrophie-Sprungmutationen: *Serratia* CV erzeugt ca. 0,5% Auxotrophie-Mutanten. Untersuchungen von 60 verschiedenen monoauxotrophen Stämmen zeigten (KAPLAN, 1961), daß unter

ihnen 5 häufig und spontan ihren ersten Bedarf verloren und eine neue Auxotrophie erwarben. Dieser sprunghafte Wechsel im Auxotrophie-Bedarf geschah von $\text{arg}^1 \rightleftharpoons \text{nia}^-$; $\text{arg}^2 \rightleftharpoons \text{his}^-$, ad^- , hyx^- ; $\text{thr}^- \rightleftharpoons \text{met}$; $\text{prol}^- \rightleftharpoons \text{his}^-$; $\text{leu}^- \rightleftharpoons \text{ad}^-$, hyx^- .

Es wurde festgestellt, daß dieser Wechsel im Auxotrophie-Bedarf ein einstufiger Prozeß ist, ohne eine intermediäre prototrophe Reversions-Stufe. Rückmutationstests mit dem Auxotrophen $\text{leu}^- \rightleftharpoons \text{ad}^-$ zeigten, daß die zweite Auxotrophie die Wirkung der ersten unterdrückt und also eine Suppressor-Mutation ist (KAPLAN, 1961). In *B. subtilis* wurde ein ähnliches Phänomen beobachtet. Drei der neun Histidin - Mutanten, die durch Hitzebehandlung des ursprünglichen Indol^- - Stammes 168 von *B. subtilis* gewonnen waren, verloren ihren Indol-Bedarf zugleich mit dem Erwerb eines Histidin-Bedarfs (EPHRATI et al, 1961).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die spontanen Mutations-Spektren von zwei verschiedenen Organismen besonders in Hinblick auf die Ursachen spontaner Mutationen zu studieren, indem das spontane Mutations-Spektrum mit dem hitzeinduzierten Spektrum verglichen wird; denn Hitzeschwingungen, wie schon erwähnt, könnten eine der Ursachen für das Entstehen spontaner Mutationen sein. Wenn dies zutrifft, sollte eine Wärmebehandlung die Mutabilität aller spontan mutierenden Gene erhöhen. Es sollte also das Mutations-Spektrum durch Hitze dem spontanen gleich sein oder zumindest ähnlich sein. Wenn allerdings die Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) der Gene nicht einheitlich sind, wären Unterschiede zu erwarten. Dies würde anzeigen, daß die den Hitzemutationen zugrunde liegenden chemischen Prozesse an der DNS nicht einheitlich sind, z.B. nicht nur Deguanierungen. Mutationstypen, die durch Hitze häufig erscheinen, könnten einen hohen Q_{10} -Wert ihrer Entstehung haben. Wenn

jedoch Mutationstypen spontan häufig sind, durch Hitze aber selten oder nicht induziert werden, so ist es sehr unwahrscheinlich, daß ihre Spontanauslösung auf Wärmewirkung beruht; denn dann müßte die sie produzierenden chemischen Reaktionen Q_{10} -Werte von nahezu eins besitzen. Für die üblicherweise angenommene Depurinierung trifft dies nicht zu. Es würde damit eine noch nicht bekannte thermische Reaktion an DNS oder eine völlig andere Entstehungsweise der Spontanmutationen, z.B. durch mutagene Metaboliten, angezeigt.^{+))}

Es wurden zwei spontan sehr mutable Stämme (*Serratia marcescens* CV/rc₃ und *E. coli* "Harvard") für die Zwecke unserer Studien ausgewählt; beide ergeben sehr häufige spontane Auxotrophie-Mutanten. Diese Mutanten können durch die Stempel-Methode (siehe Methodik) leicht gefunden werden, ohne daß dabei Selektion eine Rolle spielt. Für die Versuche wurden deshalb keine stabilen Stämme genommen, weil sonst zur Isolation spontaner Mutationen irgendein Selektions-Vorgang, z.B. die Penicillin-Methode (DAVIS, 1950), benutzt werden müßte, was unter Umständen zur bevorzugten Auswahl einer besonderen Sorte von Auxotrophen führen könnte. Dies würde dann kein unverzerrtes spontanes Auxotrophiemutations-Spektrum liefern. Außerdem solle nebenher das Auftreten von Sprungmutationen in beiden Stämmen untersucht werden.

^{+))} Dieser Gedankengang stammt von Prof. KAPLAN.

II. Material und Methodik

A. Bakterienstämme:

1. *Serratia marcescens* CV/rc₃ (Bakterium prodigiosum), isoliert im Institut für Mikrobiologie, Frankfurt/Main vom *Serratia* CV, ein Stamm aus dem Hygiene Institut Marburg.
2. *E. coli* "Harvard"-Stamm (T 190), aus K.W.W. Frues Bakteriologisk Institut Oslo. (GOLDSTEIN et al 1955; JYSSUM, 1960).

B. Medien usw.:

Als Kompletmedium wurde 1,75% Bacto-Penassay Broth (Difco) mit 1,5% Agar (Difco) benutzt. Als spezielles Kompletmedium für den "Harvard"-Stamm wurde 3,7% Bacto Brain-Heart-Infusion Broth (Difco) mit 1,5% Agar verwendet (Difco Manual, 1953). Die obengenannten Medien wurden auch als flüssiges Medium ohne Agarzusatz verwendet. Als Minimal-Medium wurde *Serratia*-Minimal-Agar (KAPLAN, 1959) benutzt. Das Minimal-Medium für *E. coli* "Harvard" enthält pro Liter: 7 g K₂HPO₄; 2 g KH₂PO₄; 0,5 g Na₃ Citrat · 5H₂O; 0,1 g MgSO₄ · 7H₂O; 1 g (NH₄)₂SO₄ und 2 g D-Glucose (JYSSUM, 1960). Bakteriensuspensionen wurden in dem üblichen Phosphatpuffer, pH 7, verdünnt.

C. Auxanographie:

Zur Bestimmung des Wuchsstoff-Bedarfes von Auxotrophie-Mutanten diente der Auxanographie-Test. Es wurde eine Kombination 36 verschiedener Wuchsstoffe (Aminosäuren, Vitamine, Purine und Pyrimidine) in 9 Lösungen zu je 8 Stoffen so zusammengestellt, daß jeder der 36 Stoffe in zwei der

Lösungen vorhanden ist. (Siehe z.B. KAPLAN, 1961.) Weiterhin sind die Stoffe so zusammengestellt, daß sie untereinander nicht reagieren.

Liste der angewandten Wachststoffe

<u>Vorhanden</u> <u>in Lösung:</u>			<u>Vorhanden</u> <u>in Lösung:</u>		
1. Fol	= Folsäure	1.+9.	22. Asp	= Asparagin- säure	4.+9.
2. Bio	= Biotin	1.+2.	23. Arg	= Arginin- säure	4.+5.
3. Hyx	= Hypoxanthin	1.+3.	24. Glu	= Glutamin- säure	4.+6.
4. Inos	= Inosit	1.+4.	25. Leu	= Leucin	4.+7.
5. Pro	= Prolin	1.+5.	26. α -Ala	= -Alanin	4.+8.
6. β -Ala	= β -Alanin	1.+6.	27. Thia	= Thiamin	5.+9.
7. Norl.	= Norleucin	1.+7.	28. Cys	= Cystein	5.+6.
8. Tyr	= Tyrosin	1.+8.	29. Thr	= Threonin	5.+7.
9. Thy	= Thymin	2.+9.	30. Lys	= Lysin	5.+8.
10. Xan	= Xanthin	2.+3.	31. Pyx	= Pyridoxin	6.+9.
11. Cyt	= Cytidin	2.+4.	32. Val	= Valin	6.+7.
12. Ur	= Uridin	2.+5.	33. Try	= Tryptophan	6.+8.
13. Ser	= Serin	2.+6.	34. Isol	= Isoleucin	7.+9.
14. Gly	= Glycin	2.+7.	35. Rif	= Riboflavin	7.+8.
15. Phe	= Phenylalanin	2.+8.	36. Nia	= Nikotin- säureamid	8.+9.
16. Pan	= Pantothenat	3.+9.			
17. Gu	= Guanin	3.+4.			
18. Ad	= Adenin	3.+5.			
19. Met	= Methionin	3.+6.			
20. His	= Histidin	3.+7.			
21. PAB	= Paramino- benzolsäure	3.+8.			

Tabellarische Darstellung der Substanzgemische in

Lösungen

Lösungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
1	Fol	Bio	Hyx	Inos	Pro	β -Ala	Norl	Tyr
2	Bio	Thy	Xan	Cyt	Ur	Ser	Gly	Phe
3	Hyx	Xan	Pan	Gu	Ad	Met	His	PAB
4	Inos	Cyt	Gu	Asp	Arg	Glu	Leu	α -Ala
5	Pro	Ur	Ad	Arg	Thia	Cys	Thr	Lys
6	β -Ala	Ser	Met	Glu	Cys	Pyx	Val	Try
7	Norl	Gly	His	Leu	Thr	Val	Isol	Rif
8	Tyr	Phe	PAB	α -Ala	Lys	Try	Rif	Nia
9	Fol	Thy	Pan	Asp	Thia	Pyx	Isol	Nia

Da ein Wachstum der Auxotrophe nur bei genügend hoher Konzentration des zugesetzten benötigten Wachstoffs sichtbar wird, wurden zunächst diese Konzentrationen bestimmt. Danach wurde in den Versuchen bei Aminosäuren je 20 mg/ml und bei Vitaminen je 10 mg/ml in den Testlösungen angewendet. Diese Konzentrationen waren ca. 10^2 bis 10^3 mal höher als die optimale Konzentration, die dem Wachstumsmedium entsprach was nötig war, da nur kleine Lösungsmengen auf die Platten gebracht werden sollten. Die verschiedenen Substanzen für jede Test-Mischung wurden einzeln ausgewogen und dann zusammen im aqua dest. gelöst. Mit diesen Test-Lösungen wurden viele kleine sterile Blättchen aus gewöhnlichem Filterpapier vom Durchmesser 5 mm, gestanzt mit einem Büro-Aktenlocher, getränkt. Anschließend wurden die Blättchen im Exsikkator getrocknet. Auf gleiche Weise wurden auch Blättchen, mit Lösungen nur je eines der Stoffe getränkt, um solche Mutanten, die mit den Mischungs-Blättchen nicht klar zu identifizieren waren, nochmals mit den Einzel-Wachstoffs-Blättchen zu testen. Diese Testblättchen wurden in großer Zahl auf Vorrat hergestellt und in verschlossenen Röhrchen bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Verwendung der Blättchen zur Auxanographie:

Zum Test wurde eine Mi-Agar Platte mit einer dichten Zellsuspension (10^8 - 10^9 Zellen) des Auxotrophen-Stammes in flüssigen (45°C) Weichagar (0,7% Agar) übergossen und dann mit den 9 wachstoffhaltigen Papierblättchen kreisförmig nahe dem Rande der Platte belegt. Wenn ein Stamm um zwei Blättchen gleichzeitig einen Wuchshof bildet, dann ist er Monoauxotroph. Wenn ein Wuchshof um nur ein Blättchen oder wenn ein Wuchsstreifen zwischen zwei Blättchen erscheint, ist die betreffende Mutante Polyauxotroph, sie benötigt mehrere Stoffe gleichzeitig. Wuchshöfe um mehr als zwei Blättchen deuten auf alternativen Bedarf für mehrere Stoffe. Durch Einzelstoff-Blättchen wurde der angezeigte Stoffbedarf gesichert.

D. Gewinnung der spontanen Auxotrophen von Serratia
CV/rc₃ und Bestimmung ihres Wuchsstoffbedarfes:

Von einer beimpften Penassay-Platte wurde eine Kolonie abgeimpft, in 10 ml Penassay-Bouillon suspendiert und dann die Suspension auf 50 - 100 Zellen/0,1 ml im Bouillon verdünnt. Zwölf Röhrchen aus solchen Suspensionen wurden im Rollapparat bei 30°C 7 Stunden bebrütet, dann wurde der Zelltitler mikroskopisch in der Zählkammer bestimmt, erneut verdünnt und je etwa 100 - 200 Zellen von jedem Röhrchen auf 4 Penassay-Platten geimpft. Nach ca. zwanzig Stunden Bebrütung bei 30°C wurden diese auf Komplettnutrientmedium gewachsenen Kolonien durch sterile Samt-Stempel (Methode nach LEDERBERG et al, 1952) auf Mi-Agar-Platten gestempelt. Nach 24-stündiger Bebrütung wurden die auf Minimal-Medium gewachsenen Kolonien mit den auf Komplettnutrientmedium gewachsenen durch Aufeinanderlegen unter dem Zählpult verglichen. Die auf Mi-Medium nicht gewachsenen Kolonien, die meist Auxotrophe waren, wurden von den entsprechenden Komplettnutrientmedium-Platten isoliert und auf Penassay-Platten ausgestrichen, registriert (Bezeichnung z.B. Serratia CV/rc₃/a₁ usw.) und bis zum Auxanographieren aufbewahrt.

Rückmutations- und Auxanographie-Test:

Die isolierten Stämme wurden zunächst durch Ausstreichen (ca. 10⁷ Zellen) auf Mi-Medium geprüft, ob sie dort nicht wachsen und also auxotroph sind und wie stark sie rückmutieren. Von stabilen oder nur schwach rückmutierenden Auxotrophen wurde dann der Wuchsstoffbedarf, wie beschrieben, auxanographisch bestimmt.

Wenn aus einem Röhrchen bzw. aus einer Kolonie zwei oder mehrere Auxotrophe stammen, die den gleichen Bedarf haben, dann gehören sie sehr wahrscheinlich zu einem gemeinsamen

Mutanten-Klon, d.h., sie gehen auf das gleiche Mutations-Ereignis zurück. Deshalb wurden solche Fälle nur einmal gezählt. Denn das Mutationstypen-Spektrum soll ja die Häufigkeit der Mutations-Ereignisse in verschiedenen Genen oder phängleichen Gengruppen wiedergeben.

E. Hitzeinduzierte Auxotrophe von Serratia CV/rc₃

Zunächst wurden Vorkulturen in Mi-Medium hergestellt, da in diesem Medium sich nur Prototrophe und seit der letzten Zellteilung prämutierte Zellen befinden. Bei Plattungen auf Komplett-Medium werden die prämutierten Zellen zu perfekten Mutanten und bilden Kolonien, die Auxotrophe Sektoren haben, da nur ein DNS-Strang prämutiert ist. Da Auxotrophe recessiv sind, teilen sich die heterokaryotisch mutierten sowie prämutierten auch in Mi-Medium, so daß auch in einer Mi-Kultur zunächst noch wenige auxotrophe Zellen vorhanden sind. Sie sterben aber darin meist sehr bald, werden also schnell von Prototroph-Zellen überwuchert. Die Häufigkeit spontaner Auxotrophen ist daher in Mi-Medium sehr gering. Um die physiologischen Bedingungen während der Mutation für spontan und hitzeinduziert mutierende Zellen möglichst vergleichbar zu machen, wurden die zu erhitzenen Zellen nach der Kultur in Minimal Medium noch für 1-2 Zellteilungen im Komplettmedium vorkultiviert. Die während dieser Zeit spontan entstehenden Mutanten sind verschwindend wenig gegenüber den hitzeinduzierten, wie spezielle Versuche ergaben.

Experimente:

Zwei bis drei Kolonien von einer frischen Minimal-Stamm-Platte wurden im 10 ml Penassay-Bouillon suspendiert, der Titer bestimmt und danach 90 Minuten im Rollapparat bei

30°C bis zum Erreichen der Wachstumsphase bebrütet. Dann wurde der Titer nochmals bestimmt. Für die Erhitzung wurden zu 9 ml in einem Wasserbad vorerhitzte Penassay-Bouillon 1 ml von der Bakteriensuspension zugesetzt und das Röhrchen geschüttelt. Zu verschiedenen Zeiten danach wurden Proben entnommen, Verdünnungen gemacht und ausgeplattet. Dadurch wurden die Hitze-Inaktivierungskurven für verschiedene Temperaturen erhalten. Diese Kurven wurden mit der (im Vorversuch) bei 55°C erhaltenen Inaktivierungskurven für stationäre Zellen (13 Stunden Bebrütung) verglichen. Die Resultate zeigten (siehe Inaktivierungskurven), daß 52,5°C für die Durchführung der "Hitzeschock"-Versuche die geeignete Temperatur ist, weil die Inaktivierungsrate nicht zu hoch ist. Daher wurden alle hitzeinduzierten Auxotrophen bei dieser Temperatur nach einer 7 1/2 minütigen Behandlung isoliert. Die Überlebensrate betrug dann etwa $2 \cdot 10^{-5}$. Zur Identifikation des Wachstumsstoffbedarfes der Mutanten diente dieselbe Methode wie die für die spontanen CV/rc₃ - Auxotrophen.

F. Spontane Auxotropie von E. coli "Harvard"

Aus den oben aufgeführten Überlegungen zur Mutationshäufigkeit auf Mi- und Komplet-Medium folgt, daß die Harvard-Stamm-Platte aus Mi-Medium bestehen sollte. Von solchen Stamm-Platten wurden jeweils die Suspensionen für die Versuche hergestellt. Die weitere Methodik war wie bei Serratia; nur die Temperatur der Bebrütung betrug 37°C.

G. Hitzeinduzierte Mutanten von E. coli "Harvard"

Die Methodik war wie bei den Hitzeschock-Versuchen mit Serratia CV. Die angewendete Temperatur betrug 58°C, die

Erhitzungsdauer = 7 1/2 Min.; die Überlebensrate ist dann 10^{-5} . Wie die Kurven (Abb. 2) zeigen, ist dieser Stamm von *E. coli* erheblich hitzeresistenter als *Serratia* CV/rc₃. Die etwa gleiche Überlebensrate von $2 \cdot 10^{-5}$ in 7 1/2 Min. wird erst bei ca. 58°C erreicht.

III. Experimentelle Ergebnisse

A. Das Spektrum der spontanen Auxotrophie-Mutanten bei Serratia CV/rc₃

Der Stamm CV von *Serratia marcescens* erzeugt spontan etwa 0,5% verschiedene Auxotrophie-Mutanten (KAPLAN, 1960). Der Anteil dieser spontanen Auxotrophen wird durch UV nicht erhöht. Dagegen werden durch UV Farbmutationen erzeugt und ihre Häufigkeit auf über 30% erhöht (KAPLAN, 1959). In Rückmutationstests konnte festgestellt werden, daß etwas mehr als die Hälfte der isolierten Auxotrophen instabil sind und rückmutieren. (Spektrum S.25-26).

Sprungmutante:

Bei der Mutanten-Isolation wurde ein Stamm gefunden (genannt CV/rc₃/ a 646), der bei der Wuchsstoffbedarfsbestimmung um zwei Blättchen, die beide Histidin enthielten, einen Schwarm von einigen Dutzenden mehr oder weniger großer Kolonien zeigte. Außerdem waren dichte Wuchshöfe aus Mikrokolonien des Grundrasens bei den 2 Blättchen, die beide Methionin enthielten deutlich zu erkennen. Im Einzelstofftest von Isolationen diesen größeren Kolonien konnte festgestellt werden, daß sie mit Histidin wuchsen und nicht mehr mit Methionin, das die Ausgangsmutante benötigte. Die ursprünglich Methionin-bedürftige Mutante scheint also spontan mit erheblicher Rate zu Histidin-Bedarf weiter mutiert zu sein, und dabei ist der erste Wuchsstoffbedarf verschwunden. Solche Mutanten werden Sprungmutanten genannt (KAPLAN, 1960). In Ausplattungen von ca. 10^{7-8} Zellen der met⁻-Mutante auf Minimal-Medium wurden nur wenige (ca. 20) Kolonien als Prototroph beobachtet. Nach Auflegen eines Histidin-Blättchens erschien aber ein Schwarm von einigen Hunderten Kolonien im Diffusionshof. Das heißt, daß ein

Zwischenschritt zur Prototrophie bei der Mutation des met^- - Stammes zu Histidin-Bedarf nicht existiert. In einem weiteren Versuch wurden mehrere Isolationen der his^- - Mutante in dichter Suspension (10^8 Zellen) auf Mi-Agar geplatet und in der Mitte Methionin enthaltende Blättchen aufgelegt. Normalerweise wächst diese Mutante nicht durch Methionin-Zugabe, aber es erschienen im Diffusionshof vom Methionin einige Dutzend großer Kolonien. Die Platten enthielten außer dieser nur noch sehr wenige erkennbare prototrophe Kolonien. Durch weitere Abimpfungen dieser großen met^- - Kolonien bekam man solche Stämme, die der met^- - Ausgangsmutante ähnlich waren. Ihre spontanen Weitermutationen zu his^- verhielten sich wie der ursprüngliche met^- - Stamm.

Es wurden insgesamt 751 spontane *Serratia CV/rc₃* Auxotrophen aus ca. $1,5 \cdot 10^5$ Kolonien isoliert. Darunter wurde nur eine einzige Sprungmutante gefunden. Das spricht für selteneres Vorkommen der Sprungmutationen als es nach den Ergebnissen von KAPLAN (1961) erschien.

B. Hitzeinaktivierung von *Serratia CV/rc₃* und das Spektrum der hitzeinduzierten Auxotrophie-Mutanten

Hitzebehandlung von stationären Zellen (13 Stunden Bebrütung) bei 55°C resultiert wie aus der Kurve ersichtlich ist, in einer geringeren Abtötung, weil einige relativ hitzeresistente Zellen mit dabei sind: 20 Minuten Hitzebehandlung läßt 10^{-3} Zellen überleben, während nach 7 1/2 Min. Hitzebehandlung bei $52,5^\circ\text{C}$ einer 1 1/2 Stunden bebrüteten Rollkultur (log Phase) nur noch $2 \cdot 10^{-5}$ Zellen überleben. Diese Temperatur und Einwirkungsdauer wurde für die Induktion der Auxotrophie-Mutanten ausgewählt.

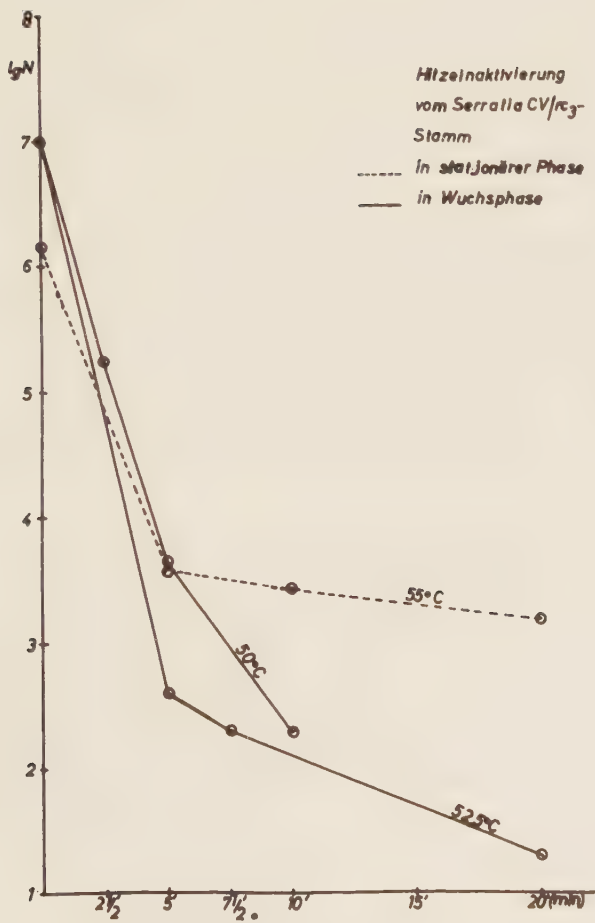
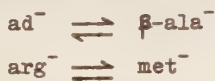


Abb. 1

Die Häufigkeit der Auxotrophen durch Hitzeschock beträgt etwa 0,4%. Um eventuelle Selektion von schon vorhandenen Auxotrophen gegenüber den Prototrophen beurteilen zu können, wurden in einem Mischungs-Versuch 15 Sorten verschiedener Auxotrophen mit prototrophen Zellen im Verhältnis 1 : 10 gemischt. Nach der Hitzebehandlung blieb das Verhältnis 1:10 von Auxotrophen zu Prototrophen unverändert. Das sagt deutlich, daß die Auxotrophen durch Hitzeschock gegenüber den Prototrophen nicht selektiv angereichert, sondern daß sie dadurch erzeugt werden. (Spektrum S.25-26)

Durch Hitzebehandlung entstehen auch etwa 2% sogenannter "pin-point" Kolonien. Diese Art der Kolonien wurden schon von ZAMENHOF et al (1958, 1960) bei E. coli beschrieben. Die winzigen "pin-point" Kolonien wachsen auf Komplet-Medium langsamer als normalgroße Kolonien. Die meisten von ihnen gewinnen ihre normale Koloniegröße nach 2 bis 3 Übertragungen auf Komplet-Medium zurück. Ihre Natur als Mutanten ist unklar.

370 Auxotrophe wurden nach der Hitzebehandlung isoliert, davon waren 208 relativ stabil. Die anderen 162 (= 44%) mutierten sehr häufig zurück, so daß sie schwer als reiner Stamm zu halten waren. Diese Häufigkeit Hochmutabler entspricht etwa der bei den Spontanmutanten. Ihr Wachstoffsbedarf wurde nicht untersucht. Durch die Wachstoffsbedarfsbestimmung von hitzeinduzierten Auxotrophen wurden 2 Auxotrophen-Stämme identifiziert, die Sprungmutation zeigten. Diese Sprungmutanten sind:



Alle Tests zur Sicherung der Sprungmutantennatur dieser Mutanten wurden so ausgeführt, wie schon vorher beschrieben wurde.

C. Das Spektrum der spontanen Auxotrophie-Mutanten bei E. coli "Harvard"

Die Häufigkeit der spontanen Auxotrophen in dem Harvard-Stamm ist etwa 1%. Darunter kommen sehr verschiedene Auxotrophen-Typen vor. Im Gegensatz zu Serratia CV/rc₃ produziert der Harvard-Stamm auch spontan etwa 1,6% "pin-point" Kolonien; wie sie bei Serratia CV/rc₃ erst nach der Hitzebehandlung erscheinen. Es wurden insgesamt 739 spontane Auxotrophen isoliert. Darunter gab es keine Sprungmutanten. Das bedeutet also, daß es in dem Harvard-Stamm keine Sprungmutationen gibt, oder zumindest sind sie so selten, daß sie experimentell nicht erfaßt wurden. Über die Hälfte der isolierten Auxotrophen mutieren spontan stark zurück zur Prototrophie. (Spektrum S.25-26).

D. Hitzeinaktivierung von E. coli "Harvard" und die Induktion von Auxotrophen

Wie bei Serratia CV/rc₃ wurden Hitzeinaktivierungen mit dem Harvard-Stamm bei verschiedenen Temperaturen (52,5°C, 55°C, 58°C, 60°C) durchgeführt. Bei 58°C, 7 1/2 Min. Einwirkungsdauer (Überlebende: etwa 10⁻⁵) wurden weitere Versuche gemacht, um die hitzeinduzierten Auxotrophen zu isolieren. Überraschenderweise zeigte sich, daß im Harvard-Stamm durch "Hitzeschock" keine Auxotrophie-Mutationen ausgelöst werden. Auch Hitzebehandlung von 60°C löste keine Auxotrophie-Mutationen aus. Nur die Häufigkeit der "pin-point" Kolonien wurde nach der Hitzebehandlung von 1,6% auf 4,8%, also dreifach, erhöht.



Abb. 2

Tabells I.

E. Vergleich des spontanen Auxotrophie-Mutanten-Spektrums von Serratia CV/rc₃ mit dem hitzeinduzierten und dem spontanen Spektrum von E. coli "Harvard".:

Wuchsstoff- bedarf.	E.coli "Harvard"		Serratia CV/rc ₃		Serratia CV/rc ₃	
	Mut.	%	Mut.	%	Mut.	%
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
	Spontane		Spontane		Hitzeinduzierte	
1.His	42	15,21	8	4,62	7	3,36
2.Arg	28	10,14	11	6,35	37	17,78
3.Glu	16	5,79	2	1,15	2	0,96
4. Ad	16	5,79	4	2,31	8	3,84
5.Unbest- imbar	15	5,43	6	3,46	8	3,84
6.Poly.	13	4,71	14	8,09	4	1,92
7.Ad,Hyx	11	3,98	21	12,31	41	19,71
8.Lys	11	3,98	3	1,73	3	1,44
9.Pro	10	3,62	7	4,04	8	3,84
10.Try	10	3,62	3	1,73	2	0,96
11.Asp	9	3,26	0	-	1	0,48
12.Met	9	3,26	2	1,15	4	1,92
13.Leu	9	3,26	16	9,24	8	3,84
14.Inos	8	2,89	4	2,31	7	3,36
15.Thia	8	2,89	1	0,57	12	5,76
16.Thr	8	2,89	5	2,89	2	0,96
17.Gly	5	1,81	3	1,73	3	1,44
18.Cyt	5	1,81	5	2,89	3	1,44
19.Nia	5	1,81	6	3,46	3	1,44
20.Ser	5	1,81	4	2,31	3	1,44
21.Cys	4	1,45	0	-	3	1,44
22.Gu	4	1,45	0	-	0	-
23.Tyr	4	1,45	1	0,57	1	0,48
24.Phe	4	1,45	1	0,57	2	0,96
25.PAB	3	1,08	0	-	0	-

(Fortsetzung nächste Seite).

Wachstoffsbedarf.	E.coli "Harvard"		:	Serratia CV/rc ₃		:	Serratia CV/rc ₃	
	Mut.	%		Mut.	%		Mut.	%
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil
	Spontane		:	Spontane		:	Hitzeinduzierte	
26.Hyx	3	1,08	:	2	1,15	:	15	7,21
27.Thy	3	1,08	:	1	0,57	:	0	-
28.Val+	2	0,72	:	8	4,62	:	0	-
Isol			:			:		
29.Val	1	0,36	:	10	5,78	:	5	2,4
30.Met,Cys	1	0,36	:	19	10,98	:	10	4,81
31.Tyr,Phe	1	0,36	:	0	-	:	0	-
32.Pro,Xan	1	0,36	:	0	-	:	0	-
33.Isol	1	0,362	:	0	-	:	0	-
34.Glu,Pyx	1	0,362	:	0	-	:	0	-
35.Pan	0	-	:	1	0,57	:	3	1,44
36.Val+	0	-	:	1	0,57	:	0	-
Inos			:			:		
37.Ad,Hyx, Cyt	0	-	:	1	0,57	:	0	-
38.Ser,Gly	0	-	:	1	0,57	:	1	0,48
39.Sprung- mut.	0	-	:	1	0,57	:	2	0,96
40.Ur Hem- mung	0	-	:	1	0,57	:	0	-
Gesamt Z.			:			:		
Aux.getestet:	276		:	173		:	208	
Hochmutable :	463		:	252		:	162	
Gesamt Z.Aux. isoliert	739		:	425		:	370	
Pinpoint%		1,6%	:			:		2%

F. Statistische Berechnungen zur Sicherung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Auxotrophie-Mutanten-Spektren

Um festzustellen, ob die Unterschiede zwischen den verschiedenen Auxotrophie-Mutanten-Spektren signifikant sind und ob auch die einzelnen Arten von Auxotrophen untereinander unterschiedlich sind, wurde der χ^2 - Test angewandt.

Es wurde gerechnet nach der Formel:

$$\chi^2_{(i-1)} = \frac{(a_i - p_i n)^2}{p_i n} + \frac{(b_i - p_i l)^2}{p_i l}$$

i = Zahl der Mutantentypen im Test.

(i-1) = 2(i-1)-(i-1) = Zahl Freiheitsgrad

Die Zahl der Freiheitsgrade (17) ergibt sich als Anzahl der frei wählbaren Mutantenhäufigkeiten ($2 \cdot 18 - 2 = 34$) minus der Zahl geschätzter Parameter p_i ($18 - 1 = 17$).

Aus der Tafel von Patau (1943) kann das entsprechende P oder die Zufallswahrscheinlichkeit für die entsprechende Anzahl Freiheitsgrade gegeben werden. Dieses P entscheidet darüber, ob die Unterschiede signifikant sind oder nicht.

(P > 20% = keine Unterschiede vorhanden;

P < 5% = Unterschiede sind wahrscheinlich und

P < 1% = Unterschiede sind signifikant)

T a b e l l e II.

χ^2 -Test für Homogenität zwischen hitzeinduzierten und spontanen Auxotrophie-Mutanten-Spektren bei Serratia CV/rc₃.

Gruppe	H i t z e i n d u z i e r t e				S p o n t a n e		$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{1p_i}$		
	Exp. Wert $p_i = \frac{a_i+b_i}{n+1}$ $=a_i$	Theoret. Wert $=p_i \cdot n$ $=(p_i \cdot 208)$	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{np_i}$	Exp. Wert $=b_i$	Theoret. Wert $=p_i \cdot l$ $=(p_i \cdot 173)$		Δ	Δ^2	
1.ad ⁻ hyx ⁻ 41	62/381 =0,163	33,90	1,54 $\Sigma=3,38$ P=7%	21	28,20		7,2	52	1,84
2.arg ⁻ (37)	48/381 =0,126	26,20	4,43 $\Sigma=9,75$ P<1%	11	21,80		10,8	116	5,32
3.hyx ⁻ (15)	17/381 =0,446	9,30	3,50 $\Sigma=7,71$ P<1%	2	7,71		5,7	32,5	4,21
4.thia ⁻ (12)	13/381 =0,0341	7,09	3,38 $\Sigma=7,45$ P<1%	1	5,90		4,9	24,01	4,07
5.met ⁻ cys ⁻ 10	29/381 =0,0761	15,82	2,15 $\Sigma=4,74$ P=3%	(19)	13,16		5,84	34,11	2,59
6.leu ⁻ 8	24/381 = 0,063	13,10	1,98 $\Sigma=4,37$ P=3,5%	(16)	10,899		5,1	26,01	2,39
7.ad ⁻ 8	12/381 =0,0315	6,55	0,32 $\Sigma=0,7$	4	5,449		1,44	2,07	0,38
8.Unbest. 8	14/381 =0,0363	7,63	0,01 $\Sigma=0,03$	6	6,3491		0,35	0,1225	0,02
9.pro ⁻ 8	15/381 =0,0393	8,17	0,00368 $\Sigma=0,00963$	7	6,7989		0, 201	0,0408	0,00595

(Fortsetzung nächste Seite!)

H i z e i n d u z i e r t e S p o n t a n e

G r u p p e	Exp. Wert =a _i	$p_i = \frac{a_i + b_i}{n+1}$	Theoret. Wert =(p _i ·208)	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{np_i}$
10.his ⁻	7	15/381	8,17	=0,167 Σ=0,379
11.inos ⁻	7	11/381	5,99	0,170 Σ=0,363
12.val ⁻	5	15/381	8,17	1,25 Σ=2,76 P=10%
13.Poly.undmet ⁻	8	24/381	13,10	1,98 Σ=4,36 P=3,5%
14.nia ⁻ und cyt ⁻	6	17/381	9,30	1,17 Σ=2,58 P=10,5%
15.ser ⁻ und pan ⁻	6	11/381	5,99	---
16.cys ⁻ und gly ⁻ und lys ⁻	9	15/381	8,17	0,0821 Σ=0,00963
17.phe ⁻ u.glu ⁻ u. try ⁻ u.Sprungmut.	8	15/381	8,17	0,00368 Σ=0,00963
18.thr ⁻ u.tyr ⁻ u. ser, gly ⁻ u.asp ⁻ u. ad, hyx ⁻ , cyt ⁻ u.val ⁻ +inos ⁻ u. thy ⁻ u.Rückmut.Ur.Hemm.u. val ⁻ +iso ⁻ .	5	24/381	13,10	5,01 Σ=11,03 P<0,1%
Σ	=208		=208,0	Σ=27,15

Exp. Wert =b _i	Theoret. Wert =(p _i ·173)	Δ	Δ ²	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{1p_i}$
8	6,79	1,2	1,44	0,212
4	4,98	0,9824	0,96	0,96
10	6,79	3,2	10,24	1,508
(16)	10,89	5,1	26,01	2,38
11	7,71	3,3	10,89	1,41
5	4,98	0,0176	0,0003	0,000
6	6,79	0,8	0,64	0,0941
7	6,79	0,201	0,0408	0,00595
(19)	10,89	8,4	65,64	6,02
(val ⁻ +iso ⁻ =8 gegenüber diese durch Hitze=0)				
Σ	=173	=173,0	Σ = 32,65	

○ =sicher bevorzugt mutierte.
 () =wahrschl. " " "
 und=u.=keine Doppel-Auxotropie, sondern
 verschiedene Aux. addiert.
 + =Doppel-Aux. ,=alternativer Bedarf.

Berechnung: (Folgerung aus der Tabelle II).

$$\text{Z.Freiheitsgrad} = 2(i-1) - (i-1) = (i-1) = 18-1 = 17$$

$$\chi^2_{(i-1)} = \frac{(a_i - p_i n)^2}{p_i n} + \frac{(b_i - p_i l)^2}{p_i l}$$

$$\chi^2_{(17)} = \quad " \quad + \quad "$$

$$\chi^2_{17} = (27,15) + (32,65)$$

$$\chi^2_{17} = 59,80$$

$$P = 1 \cdot 10^{-6}.$$

Der Unterschied zwischen den hitzeinduzierten und den spontanen Auxotrophie-Mutanten-Spektren bei *Serratia CV/rc₃* ist damit statistisch nachgewiesen.

In der Abb. 3 sind die 3 gewonnenen Auxotrophen-Spektren als graphisches "Relieff" dargestellt. Die Reihenfolge der Typen ist nach deren abnehmender Häufigkeit bei *E.coli* Harvard gewählt. Die Teil- χ^2 der Einzeltypen und ihre P-Werte (bei 1 Freiheitsgrad) sind in der 4. Zahlenspalte der Tab. II u. III abzulesen. Sie zeigen an, welche Mutationstypen den Hauptbeitrag zum Unterschied zwischen den Spektren leisten und also durch Hitze bevorzugt (O), oder benachteiligt (Δ) gegenüber den spontanen induziert werden ($P \leq 1\%$). Diese Typen sind im Graphikon Abb. 3 markiert (O, Δ).

T a b e l l e.III.

χ^2 -Test für Homogenität zwischen spontanen Auxotrophie-

Mutanten-Spektren von E.coli Harvard und Serratia CV/rc₃

S p o n t a n e E.coli Harvard's p o n t a n e					C V / r c ₃ -(Serratia)				
Gruppe	Exp. Wert =a _i	$p_i = \frac{a_i + b_i}{n+1}$	Theoret. Wert =p _i ·276	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{np_i}$	Exp. Wert =b _i	Theoret. Wert p _i ·173	Δ	Δ^2	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{1p_i}$
1.his ⁻	(42)	50/449 =0,111	30,8	4,07 Σ=10,61 P<0,2%	8	19,2	11,2	125,4	6,54
2.arg ⁻	28	39/449 =0,0870	24,00	0,667 Σ=1,727 P=20%	11	15	4	16	1,06
3.glu ⁻	(16)	18/449 =0,0401	11,1	2,16 Σ=5,64 P=1,75%	2	6,9	4,9	24,0	3,48
4.ad ⁻	16	20/449 =0,445	12,3	1,11 Σ=2,89 P=9%	4	7,7	3,7	13,7	1,78
5.Unbest.	15	21/449 =0,0468	12,9	0,341 Σ=0,884 P=30%	6	8,1	2,1	4,4	0,543
6.Poly.	13	27/449 =0,0602	16,6	0,782 Σ=2,022 P=16%	14	10,4	3,6	12,96	1,24
7.ad ⁻ hyx ⁻	11	32/449 =0,0713	19,7	3,84 Σ=9,99 P<0,2%	(21)	12,3	8,7	75,7	6,15
8.lys ⁻	11	14/449 =0,0312	8,6	0,671 Σ=1,741 P=19%	3	5,4	2,4	5,76	1,07
9.pro ⁻	10	17/449 =0,0379	10,4	0,0154 Σ=0,0396 P=25%	7	6,6	0,4	0,16	0,0242

(Fortsetzung nächste Seite)

S p o n t a n e E.coli Harvard					S p o n t a n e		Serratia CV/rc ₃ ---			
Gruppe	Exp. Wert =a _i	$p_i = \frac{a_i + b_i}{n+1}$	Theoret. Wert =p _i · 276	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{np_i}$	Exp. Wert		Theoret. Wert =p _i · 173	Δ	Δ^2	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{1p_i}$
10.try ⁻	10	13/449 =0,0290	8,0	0,5 $\Sigma=1,3$ P=25%	3		5	2	4,0	0,8
11.asp ⁻ (9)		9/449 =0,0201	5,5	2,23 $\Sigma=5,73$ P = 1,7%	0		3,5	3,5	12, 25	3,5
12.met ⁻	9	11/449 =0,0245	6,8	0,713 $\Sigma=1,863$ P=17%	2		4,2	2,2	4,84	1,15
13.leu ⁻	9	25/449 =0,0556	15,4	2,66 $\Sigma=1,863$ P<1%	16		9,6	6,4	41	4,27
14.inos ⁻	8	12/449 =0,0268	7,4	0,0487 $\Sigma=0,1270$	4		4,6	0,6	0,36	0,0783
15.thia ⁻	8	9/449 =0,0201	5,5	1,13 $\Sigma=2,91$ P= 9%	1		3,5	2,5	6,25	1,78
16.thr ⁻	8	13/449 =0,0290	8,0	-----	5		5,0	0,0	0,0	-----
17.gly ⁻	5	8/449 =0,0178	4,9	0,00204 $\Sigma=0,00526$	3		3,1	0,1	0,01	0,00322
18.cyt ⁻	5	10/449 =0,0233	6,1	0,198 $\Sigma=0,508$ P=48%	5		3,9	1,1	1,21	0,310
19.nia ⁻	5	11/449 =0,0245	6,8	0,477 $\Sigma=1,249$ P=26%	6		4,2	1,8	3,24	0,772
20.ser ⁻	5	9/449 =0,0201	5,5	0,0454 $\Sigma=0,1167$ P=72%	4		3,5	0,5	0,25	0,0713

(Fortsetzung nächste Seite)

S p o n t a n e E . c o l i H a r v a r d .

Gruppe	Exp. Wert =a _i	$p_i = \frac{a_i + b_i}{n+1}$	Theoret. Wert =p _i · 276	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{np_i}$
21. cys ⁻ u. gua ⁻ (8)	8/449 =0,0178		4,9	1,96 Σ=5,06 P=2,5%
22. tyr ⁻ u. phe ⁻ 8	10/449 =0,0223		6,1	0,592 Σ=1,517 P=22%
23. pab ⁻ u. hyx ⁻ 6	8/449 =0,0178		4,9	0,247 Σ=0,637 P=42%
24. val ⁻ + isol ⁻ 2	10/449 =0,0176		4,9	0,247 Σ=0,637 P=42%
25. val ⁻ 1	11/449 =0,0245		6,8	4,94 Σ=12,94 P<0,1%
26. met ⁻ , cys ⁻ 1	20/449 =0,0445		12,3	10,37 Σ=26,97 P<0,1%
27. thy ⁻ u. tyr ⁻ , 7 phe ⁻ u. xan ⁻ , pro ⁻ u. isol ⁻ u. glu ⁻ , pyx ⁻ u. pan ⁻ u. val ⁻ + inos ⁻ u. ad ⁻ , hyx ⁻ , cyt ⁻ u. ser ⁻ , gly ⁻ u. Sprung u. Ur.-Hemmung.	14/449=0,0268	8,6	0,297 Σ=0,770 P=38%	
Σ	=276		=276	Σ=42,82654

Berechnung: (Folgerung aus der Tabelle III)

$$Z. \text{Freiheitsgrad} = 2(i-1) - (i-1) = (i-1) = 26$$

$$\chi^2_{26} = (42,826 + 68,430)$$

$$\chi^2_{26} = 111,256 \quad P < 10^{-10}$$

Der Unterschied zwischen den spontanen Auxotrophie-Mutanten-Spektren von E.coli Harvard und Serratia CV/rc₃ ist auch damit statisch nachgewiesen.

Spontane Serratia CV/rc₃

Exp. Wert =b _i	Theoret. Wert =p _i · 173	Δ	Δ ²	$\chi^2 = \frac{\Delta^2}{1p_i}$
0	3,1	3,1	9,61	3,10
2	3,9	1,9	3,61	0,925
2	3,1	1,1	1,21	0,390
2	3,1	1,1	1,21	0,390
(10)	4,2	5,8	33,6	8,0
(19)	7,7	11,3	127,7	16,60
7	5,4	1,6	2,56	0,473
=173	=173		Σ=68,43002	

D i s k u s s i o n

Bevor die verschiedenen experimentellen Befunde diskutiert werden, sollen sie vorher kurz zusammengefaßt werden:

1. Das spontane Auxotrophie-Mutanten-Spektrum von *Serratia* CV/rc₃ unterscheidet sich von dem der hitzeinduzierten in statistisch signifikanter Weise.
2. Hitzebehandlung (7 1/2 Min.; bis zu 60°C = $4 \cdot 10^{-6}$ Überlebende) ergab in dem Harvard-Stamm keine bemerkbare Zunahme der Häufigkeit von Auxotrophie-Mutanten.
3. Die spontanen Auxotrophie-Mutanten-Spektren von *E. coli* "Harvard" und *Serratia* CV/rc₃ zeigen statistisch signifikante Unterschiede.
4. In *Serratia* CV/rc₃ sind drei verschiedene Sprungmutanten festgestellt worden:
 - a) $\text{met}^- \rightleftharpoons \text{his}^-$
 - b) $\text{ad}^- \rightleftharpoons \beta\text{-ala}^-$
 - c) $\text{arg}^- \rightleftharpoons \text{met}^-$
5. Der Harvard-Stamm von *E. coli* weist keine Sprungmutanten auf.

Im folgenden sollen die einzelnen Punkte diskutiert werden:

1. Der Unterschied zwischen spontanen und hitzeinduzierten Spektren von Auxotrophie-Mutanten bei *Serratia* CV/rc₃ scheint bedeutsam für das Verständnis des Mechanismus

der Spontanmutation zu sein. Die alternativ Methionin oder Cystein benötigenden Auxotrophen erscheinen spontan häufiger als nach Hitzebehandlung.

Zusätzlich treten spontan leu^- (Gruppe 6), Polyauxotrophe und met^- (Gruppe 13) und andere Auxotrophen (Gruppe 18; siehe Tabelle II) auch häufiger auf (S. Abb. 3). Andererseits sind arg^- ; hyx^- ; und $thia^-$ - Auxotrophe (auch in Tabelle II) wesentlich häufiger nach Hitzebehandlung als spontan (0 in Abb. 3).

Wie schon vorher beschrieben, wurden Wärmeschwingungen in der DNS als eine der möglichen Ursache für spontane Mutationen betrachtet (TIMOFEEFF-RESSOVSKY, ZIMMER und DELBRÜCK, 1935). Die beschriebenen Unterschiede in Mutantenspektren weisen jedoch auf die Tatsache hin, daß dieses nicht für alle Mutationstypen wahrscheinlich ist. Bei *Serratia* CV/rc₃ scheinen zumindest nicht alle spontan erscheinenden Auxotrophie-Mutationen durch die Wirkung der überschwelligen Wärmeschwingungen verursacht zu sein. Wenn dies der Fall wäre, würde man nicht finden, daß die häufig spontan erscheinenden Mutanten der Gruppe 5, 6, 13 und 18 nach Hitzebehandlung vergleichsweise weniger vorkommen. Hitzebehandlung sollte meist nur in Erhöhung der Häufigkeit der spontan erscheinenden Mutanten resultieren. Sollten Temperaturschwankungen die Ursache für spontane Mutationen sein, dann sollte man durch Erhöhung der molekularen Wärmeschwingungen erwarten, daß die vorher genannten 4 Gruppen von Mutanten auch häufiger erscheinen als sie spontan zu finden sind. Aber die Ergebnisse sind den Erwartungen solch einer Theorie entgegengesetzt.

Wenn Mutationstypen spontan häufig sind, durch Hitze aber selten oder nicht induziert werden, so ist es nicht wahrscheinlich, daß ihre Spontanentstehung auf Wärmeschwin-

gungen zurückzuführen ist. In so einem Fall müßten die chemischen Reaktionen, die solche spontane Mutationen produzieren könnten, Q-10 Werte von etwa eins besitzen. Dies kann aber für die allgemein angenommene Depurierung nicht zutreffen. Dieses Problem wurde schon in der Einleitung näher besprochen. Dies bedeutet also, daß die Theorie von TIMOFEEFF-RESSOVSKY, ZIMMER und DELBRÜCK, welche die Temperaturschwingungen als die Ursache spontaner Mutationen ansieht, sehr wahrscheinlich nicht allgemein zutrifft, wenigstens nicht für einige Auxotrophie-Mutanten-Typen von *Serratia* CV/rc₃. Zumindest kann gesagt werden, daß Temperaturschwingungen in dem "Atomverbände" der DNS-Struktur nicht die wichtigste Rolle bei der Verursachung der spontanen Mutationen spielen können.

2. Weiterhin ist der Befund interessant, daß bei *E. coli* "Harvard" Hitzebehandlung (bis 60°C, Überlebende = $4 \cdot 10^{-6}$) keine Auxotrophie-Mutationen erzeugt. Wir wissen, daß der Harvard-Stamm ein Mutator-Gen enthält. Obwohl es noch nicht gelungen ist, irgendeine mutagene Substanz aus einem Zellfiltrat dieses Stammes zu isolieren, so ist es doch sehr wahrscheinlich, daß das häufige spontane Mutieren von *E. coli* "Harvard" auf der Produktion irgendwelcher mutagenen Substanz(en) beruht, wie z.B. Wirkstoffe, Enzyme, intermediäre metabolische Produkte oder noch andere unbekannte Stoffe. Wenn die eben genannten chemischen Produkte die Ursache der spontanen Mutationen im Harvard-Stamm sein sollten, dann müßte eine Erhöhung der Wärmeschwingungen nicht unmittelbar in der Lage sein, spontane Auxotrophie-Mutationen zu erzeugen. Nur wenn wir Wärmeschwingungen als die Ursache spontaner Mutationen annehmen, sollte eine Erhöhung in der Wärmeenergie (Wärmeschwingungen) in der Erhöhung der Mutationshäufigkeit resultieren. Befunde dieser Arbeit, daß die Hitzebehandlung keine Auxotrophie-

Mutationen erzeugt, sprechen dafür und verstärken den Schluß, der aus der Hitzebehandlung von *Serratia* CV/rc₃ gewonnen wurde, daß die Erzeugung der spontanen Auxotrophie-Mutationen nicht auf Wärmeschwingungen beruht. Noch verstärkt wird dieser Befund, wenn man die spontane Mutations-Häufigkeit von dem Stamm *Serratia* CV mit anderen *Serratia*-Stämmen vergleicht. Die anderen Stämme sind im Vergleich zu Stamm CV relativ stabil. Es ist durchaus möglich, daß der Stamm CV in gleicher Weise entstanden ist wie der Stamm *E. coli* "Harvard": In einem normalerweise stabilen *Serratia*-Stamm ist durch eine spontane Mutation ein Mutator-Gen eingeführt worden. Danach müßten die spontanen Mutationen bei *Serratia* CV auch durch mutagene Metaboliten verursacht sein.

3. Das Spektrum der spontanen Auxotrophen des Harvard-Stammes unterscheidet sich ebenfalls sehr von dem des *Serratia* CV/rc₃-Stammes ($P < 10^{-10}$). Dies könnte so interpretiert werden, daß bei *Serratia* CV/rc₃ die Auxotrophie-Mutationen durch andere intermediäre Metaboliten verursacht werden als im Harvard-Stamm, d.h. die mutagenen Metaboliten beider Organismen üben eine unterschiedliche, "elektive Wirkung" auf verschiedene Gene aus.

Die elektive Wirkung des Mutator-Gens bei spontanen Auxotrophie-Mutationen bei *E. coli* "Harvard" scheint eindeutig zu sein. Das gesamte Auxotrophie-Mutanten-Spektrum, wie schon vorher erwähnt, unterscheidet sich sehr von dem des CV/rc₃-Stammes. Im "Harvard"-Stamm sind his⁻ - Auxotrophe etwas weniger, arg⁻ - Mutanten sehr häufig. Hinzu kommt, daß das Auxotrophie-Mutanten-Spektrum des Harvard-Stammes einen höheren Prozentsatz von asp⁻ - und cys⁻ - und gu⁻ - Mutanten besitzt⁺ als der Stamm CV/rc₃; im Gegensatz hierzu stehen die nie-

drigen Prozentsätze für ad^- -, hyx^- -und leu^- -und val^- -
- und met^- - , cys^- - Mutanten im Harvard-Stamm,
verglichen mit dem Stamm CV/rc₃, wo diese Auxotrophen
häufig gefunden werden. Von besonderem Interesse ist das
Auftreten von Mutanten, die met^- oder cys^- als alternati-
ven Bedarf haben. Ihre Häufigkeit unter den verschiedenen
spontanen Auxotrophen des Stammes CV/rc₃ beträgt etwa 11%,
während sie im Harvard-Stamm nur 0,4% ausmacht. Dies könnte
bedeuten, daß im Stamm CV/rc₃ die entsprechenden Loci sol-
che Gene, die verantwortlich sind für die Methonin- oder
Cystein-Synthese, sich verhältnismäßig unstabil verhalten
(d.h. sehr mutierbar sind), während diese im Harvard-Stamm
sehr stabil zu sein scheinen.

Hitze scheint die DNS nicht zufallsgemäß anzugreifen, son-
dern ist eher spezifisch (elektiv) in ihrer Wirkung. ZAMEN-
HOF et al (1958, 1960) fanden in ihren Experimenten, daß
unter hitzeinduzierten Auxotrophen von E. coli und B. sub-
tilis $thia^-$ - Auxotrophen häufiger auftreten. Die vorlie-
genden Befunde deuten an, daß dies auch bei Serratia CV/rc₃
der Fall ist, wo häufig (5,8%) $thia^-$ - Auxotrophe nach
Hitzebehandlung isoliert wurden. Außerdem bringt das häu-
fige Auftreten der arg^- - und hyx^- - Auxotrophen die Mög-
lichkeit näher, daß die Struktur der entsprechenden Loci
in diesen Gen^{en} so beschaffen ist, daß sie sehr anfällig für
Mutation durch Hitzeschock sind. Die oben erwähnten Gene könn-
"hot-spots" für Hitze enthalten. In solchen Fällen mag nicht
nur die Struktur eines einzelnen Nukleotidpaares eine Rolle
spielen, sondern die benachbarten Nukleotidpaare könnten
auch mit dafür verantwortlich sein, ob eine bestimmte Stelle
(oder mehrere Stellen) in einem Gen durch die Tätigkeit ei-
nes bestimmten mutagenen Agens mutiert, und wie groß dessen
Ausmaß ist.

RUDNER und BALBINDER (1960) prüften die durch BU und AP verursachten Rückmutationen in verschiedenen Pseudoallelen der try-D⁻ - Mutanten von *Salm.typhimurium*. Sie fanden, daß 5 der obengenannten Allele durch AP und BU zu try⁺ mutierten, eine nur durch AP, und zwei wiesen gar keine Rückmutanten auf. Allerdings sind Rückmutationen sehr spezifische Veränderungen, weil meist die Normalisation (Rückmutation) einer bestimmten "Stelle" innerhalb eines Gens notwendig ist. Jedoch ist die elektive Wirkung der mutagenen Agenzien auf verschiedene Gene bei Vorwärts-Mutationen zu Auxotrophie-Bedarf auch gefunden worden, wo die Mutation in irgendwelchen Stellen innerhalb eines Gens oder mehrerer Gene für die Produktion derselben Mutations-Art (z.B. die Unfähigkeit, Arginin zu synthetisieren) genügt. Das Spektrum biochemischer Mutanten, die durch die Wirkung von N-Nitroso-N-Methylurethan (NMU) isoliert wurden, ist sehr verschieden von den Spektren, die durch UV- und X-Strahlen hervorgebracht wurden (ZETTERBERG, 1961). Die Aminosäure benötigenden Auxotrophen treten wesentlich häufiger nach NMU-Behandlung auf als nach UV- oder X-Bestrahlung. Weiterhin waren his⁻ - Auxotrophe, die sehr selten unter den verschiedenen Arten der nach X- und UV-Bestrahlung isolierten Auxotrophen vorkamen, sehr häufig unter den nach NMU-Behandlung entstandenen Auxotrophen. Hitze produziert, nach den hier vorgelegten Ergebnissen, ebenfalls ein sehr spezifisches Spektrum. Dies alles bedeutet, daß hier die elektive Wirkung nicht nur auf ein Gen beschränkt ist, sondern viele Gene betrifft.

Auf "pin-point" Kolonien, die auch manchmal als "Pseudo-auxotrophe" bezeichnet werden, wurde schon in der Einleitung eingegangen. Solche Kolonien entstehen bei *Serratia* CV/rc₃ erst nach der Hitzebehandlung. Im Gegensatz dazu wurden solche "Mutationen" bei *E. coli* "Harvard" häufig unter den spontanen Kolonien gefunden. Nach Hitzebehandlung

wird die Häufigkeit solcher Kolonien auf das Dreifache erhöht. Auch hierin deutet sich eine Elektivität der Hitze-wirkung an. Die meisten dieser "pin-point"-Kolonien waren unstabil: sie gewannen ihre normale Kolonie-Größe nach einigen Überimpfungen auf Komplet-Medium zurück. Dieser phänotypische Schaden und die Verkleinerung der Kolonie-Größe könnte auf Hitze-Denaturierung einiger notwendiger Enzyme beruhen, die erst nach längerer Teilungsruhe überwunden wird (ZAMENHOF, 1960). Es ist z.B. möglich, daß das verspätete Wachsen einiger "pin-point" Kolonien durch ungenügende Produktion des einen oder anderen Enzyms entsteht.

Sprungmutationen:

In der vorliegenden Arbeit wurde auch auf die vorkommenden Auxotrophie-Sprung-Mutanten geachtet. Daß nur drei unter 1121 auxotrophen *Serratia* CV/rc₃ Stämmen Sprungmutationen zeigten, spricht für die Seltenheit der obengenannten Erscheinung. Die verschiedenen Tests, die durchgeführt wurden, um die Natur der Sprungmutanten zu erklären, zeigen deutlich, daß der Wechsel in der Auxotrophie nicht bewirkt wird durch die Erscheinung eines intermediären Prototrophie-Zustandes, sondern daß dieser Wechsel von einer Auxotrophie zu einer anderen ein Prozeß in einem Schritt ist. Rückmutationsexperimente zeigten, daß die zweite Auxotrophie-Mutation (z.B. des His-Gens) als ein Suppressor der ersten Auxotrophie-Mutation (z.B. des Met-Gens) wirkt. Weil die zweiten Mutanten die ersten nicht syntrophisch füttern und weil beide Wuchsstoff-Bedarf für solche Substanzen haben, die in keiner Weise miteinander verwandt sind, scheint es möglich, daß das Zusammenwirken der zwei beteiligten Gene nicht durch die Bildung ähnlicher Zwischenprodukte stattfindet, sondern eher durch beiderseitigen Informationsbesitz (sharing of Information!) über die Enzyme selbst. Dies soll bedeuten, daß das zweite Gen in seinem allelen Zustand (z.B. his⁻) in einer Form sein könnte, in der es

die Produktion oder, wahrscheinlicher, die Wiederaktivierung eines Enzyms (z.B. notwendig für Methionin-Synthese) veranlaßt, daß durch die Mutation des ersten Gens verloren oder inaktiviert wurde. Wenn dies zutreffen sollte, dann bedeutet es, daß nicht nur das erste Gen verantwortlich für die Produktion eines besonderen Enzyms ist, sondern daß auch das zweite Gen in seinem allelen Zustand dasselbe Enzym mitzubestimmen vermag. Nach der Hypothese von BEADLE (1951) ist ein Gen verantwortlich für die Formation eines einzigen Enzyms. Die vorliegenden Studien mit Sprungmutationen weisen ebenso wie frühere Studien (KAPLAN, 1964) auf die Möglichkeit hin, daß die Information über die Spezifität eines Enzyms (zumindesten in einigen Fällen) in mehr als einem Gen enthalten sein kann. Keine Sprungmutationen wurden in einer großen Zahl von Auxotrophen (739), die aus *E. coli* "Harvard" isoliert wurden, festgestellt. Dies bedeutet nicht, daß das Auftreten von Sprungmutationen auf einem besonderen Mikroorganismus wie *Serratia* beschränkt ist, sondern es heißt, daß die Sprungmutationen im Harvard-Stamm noch seltener sind als im CV/rc₃-Stamm von *Serratia*.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Hitzeinduzierte und spontane Auxotrophie Mutanten wurden isoliert, um zu untersuchen, ob die spontanen Mutationen durch Wärmeschwingungen verursacht werden. Der Vergleich zwischen hitzeinduzierten und spontanen Auxotrophie-Mutanten-Spektren des Stammes *Serratia marcescens* CV/rc₃ zeigt, daß Wärmeschwingungen nicht die alleinige Ursache für spontane Mutationen sein dürften. Daß Hitzeschock in *E. coli* "Harvard" überhaupt keine Auxotrophie-Mutanten induzierte, schließt es für alle Auxotrophie-Mutationen dieses Stammes aus, daß ihre spontane häufige Entstehung vorwiegend auf Wärmeschwingungen zurückzuführen ist.

Die spontanen Auxotrophie-Mutanten-Spektren der obengenannten zwei Stämme sind ebenfalls signifikant verschieden. Dies weist darauf hin, daß die spezifische Wirkung mutagener Agenzien, die solche Mutationen in beiden Organismen hervorrufen, unterschiedlich oder elektiv ist. Möglichkeiten wurden diskutiert, die mutagene Metaboliten als Ursache für spontane Mutationen in den obengenannten Organismen betrachten.

Drei neue Typen von Auxotrophie-Sprungmutationen wurden beim Stamm *Serratia* CV/rc₃ gefunden. Diese wurden im einzelnen besprochen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. R.W. KAPLAN, möchte ich hiermit für die Überlassung des Themas und Leitung der Arbeit mit vielseitigen Anregungen und ständiger Hilfsbereitschaft meinen herzlichsten Dank ausdrücken.

Auch den Assistenten des Instituts für Mikrobiologie, insbesondere Herrn Dr. MENNIGMANN und Herrn Dr. WINKLER fühle ich mich für ihre nützlichen Hinweise zu Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. KAPLAN sowie Herrn Dr. MENNIGMANN verdanke ich intensive sprachliche Hilfe und ergänzende Gedanken bei der Abfassung des Manuskriptes.

Literaturverzeichnis

- AUERBACH, CH.: Mutagenesis, with particular reference to Chemical factors. S. 78-160 in "Mutations", Second Conference on Genetics, 1960. Ann Arbor: The University of Michigan Press.
- " " : Spontaneous mutations in dry spores of *Neurospora crassa*. Z.indukt. Abstamm.Vererb.Lehre 90, S. 335-46 (1959).
- BAUTZ-FREESE, E.: Transitions and transversions induced by Depurinating agents. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, S. 540-45 (1961).
- BAUTZ, E. und E. FREESE.: On the mutagenic effect of alkylating agents. Proc. Nat. Acad. Sci. 46, S. 1585-94 (1960).
- BEADLE, G.W.: Chemical genetics in: Genetics in 20th. Century. S. 221-39, New York; Macmillan, 1951.
- BENZER, S. und E. FREESE.: Induction of specific mutations with 5-BU. Proc. Nat. Acad. Sci. 44, S. 112-19 (1958).
- BENZER, S.: On the topography of genetic fine Structure. Proc. Nat. Acad. Sci. 47, S. 403-15 (1961).
- BONNER, D.M.: The genetic unit. Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol. 21, S. 163- 70 (1956).

- BRADLEY, S.G.: Genetic analysis of segregants from heterocaryons of *Streptomyces coelicolor*. J.Bact. 76, S. 464-70 (1958).
- DAVIS, B.D.: Studies on nutritionally deficient bacterial mutants isolated by means of penicillin. Experientia 6, 41-50(1950).
- DEMEREK, M.: Unstable genes in *Drosophila*. Cold Spr. Harbor Symp.Quant.Biol. 9, S. 145-50 (1941).
- " " : Origin of bacterial resistance to Antibiotics. J.Bact. 56, S. 63-74 (1948).
- " " : Frequency of deletions among spontaneous and induced mutations in *Salmonella*. Proc.Nat.Acad. Sci.(Wash.) 46, S. 1075-79 (1960).
- DEMEREK, M; G. BERTANI und J. FLINT.: A survey of chemicals for mutagenic action on *E.coli*. Am. Nat. 85, S. 119-36 (1951).
- DEMEREK, M; P.E. HARTMANN, H. MOSER, D. KANAZIR, Z.E. DEMEREK, P.L. FITZGERALD, S.W. GLOWER, E.L. LAHR, W.E. WESTOVER und T. YURA.: Bacterial Genetics I. Carnegie Inst. Wash. Yearbook 54, S. 219-30 (1955) und folgende Bände.
- EPHRUSSI, B.und H.H. HOTTINGER.: On an unstable cell state in Yeast. Cold.Spr.Harbor Symp.Quant. Biol. 16, S. 75-85 (1951).
- EPHRATI-ELIZUR, SRINIVASAN und ZAMENHOF.: References in the Proc. Nat. Acad.Sci. 47, S. 56 (1961).

- FREESE, E.: On the molecular explanation of spontaneous and induced mutations. Brookhaven Symp. in Biol. Nr. 12, S. 63-73 (1959).
- " " : The difference between spontaneous and base-analogue induced mutations. Proc. Nat. Acad. Sci. 45, S. 622-33 (1959).
- " " : The specific mutagenic effect of base-analogues on Phage T₄. J. Mol. Biol. 1, S. 87-105 (1959).
- GOLDSTEIN, A. und SMOOT, J.: A strain of E. coli with an unusually high rate of auxotrophic mutations. J. Bact. 70, S. 588-95 (1955).
- GREER, S. und S. ZAMENHOF.: Loss of purines from DNA heated in mutagenic conditions at physiological pH. Federation Proc. 18, S. 238 (1959).
- " "und " " : Studies on depurination of DNA by heat. J. Mol. Biol. 4, S. 123-41 (1962).
- HEINZ, H.; R. W. KAPLAN.: Einfluss der Temperatur während der UV-Bestrahlung auf Inaktivierung und Mutation des Bakteriums *Serratia* sowie des Bakteriophagen Kappa. Dissertation Nat. Fakultät, Universität Frankfurt/M; (1964).
- JINO, T. und J. LEDERBERG.: An analysis of monophasic variants of *Salmonella*. Genetics 42, 378 (1957).

- JYSSUM, K.: Observations on two types of genetic instability in *E.coli*. *Acta Path.Micro. Scandinavica*, Vol. 48, S. 113-20 (1960).
- KAPLAN, R.W. : Auslösung von Farbensektor und anderen Mutationen bei *Bakterium prodigiosum* durch monochromatisches Ultraviolett verschiedener Wellenlängen. *Z.Naturforsch.* 7b, S. 291-304 (1952).
- " " : Studien über die UV-Mutabilität verschiedener Stämme von *Serratia* und über die Natur der Färbungsmutationen. *Arch.f. Mikro.* 32, S. 138-60 (1958).
- " " : Spontane Mutation von einer monoauxotrophie zu einer anderen in einem Schritt (Auxotrophiesprungmutation). *Z. Vererb.* 92, 21-27 (1961).
- " " : Genetik der Mikroorganismen. *Fortschr. Botanik* 23, S. 286-303 (1961).
- " " und S.K. BOSE. : Auslösung von Mutationen verschiedener Typs durch Behandlung des extrazellulären Phagen "Kappa" von *Serratia* mit Nitrit. *Z. Allg.Mikro.* 1, S. 274-85 (1961).
- KAUDEWITZ, F.: Production of bacterial mutants with Nitrous acid. *Nature* 183, S. 1829-30 (1959).
- " " : Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von *E.coli*. *Z.Natforsch.* 14 b, S. 528-37 (1959).

- LEDERBERG, J.: Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. Methods in med. Research 3, S. 5-22 (1955).
- LEDERBERG, J. und E.H. LEIDERBERG.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J.Bact. 63, S. 399-406 (1952).
- McCLINTOCK, B.: Chromosome organisation and genic expression. Cold Spr. Harbor Symp. Quant.Biol. 16, S. 13 (1951).
- McFALL, E. und A.S. PARDEE und J.S. STENT.: Effects of radio-phosphorous decay on some synthetic capacities of bacteria. Biochim. biophys. Acta 27, S. 282-97 (1958).
- MILES, H. TODD.: Tautomeric forms in a Polynucleotide Helix and their bearing on the structure of DNS. Proc. Nat. Acad. Sci. 47, S. 791-802 (1961).
- MIYAKE, T.: Mutator factor in Salm. typhimurium. Genetics 45, 11-14 (1960).
- NAKADA, D; E. STRELEOFF, R. RUDNER und F.J. RYAN.: Is DNA replication a necessary condition for mutation? Z. Vererb. 91, S. 210-13 (1960).
- NEWCOMBE, H.B.: Radiation induced instabilities in Streptomyces. J.Gen.Microbiol. 9, S. 30 (1953).
- NOVICK, A.: Antimutagens. Brookhaven Symp. Quant. Biol. 8, 210-16 (1956).

- PÄTAU, K. : Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine t-Tafel). Biol. Zentralblatt 63, S. 153 (1943).
- RYAN, F.J.: Unveröffentlichtes Labormanual "Microbial Genetics". Das Mischungsschema wurde von K.C.ATWOOD entworfen. Für 10 Stoffe A....K in 5 Lösungen lautet es z.B.
1. A B C D
 2. B E F G
 3. C F H J
 4. D G J K
 5. A E H K
- " " : Spontaneous mutations in nondividing bacteria. Genetics 40, S. 726 (1955).
- " " : Bacterial mutation in a stationary phase and the question of cell turnover. J.Gen.Microbiol. 21, S. 530 (1959).
- STRAUS, B. und S. OKUBO. : Protein synthesis and the induction of mutations in E.coli by alkylating agents. J.Bact. 79, S. 464-73 (1960).
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N.W; K.G. ZIMMER und M.DELBRÜCK.: Über die Natur der Genmutationen und der Genstruktur. Nachr.Ges.Wiss, (Göttingen)6-N.F.1, S. 189 (1935).
- " ,M.DELBRÜCK.: Strahlengenetische Versuche über sichtbare Mutationen und die Mutabilität einzelner Gene bei Drosophila melanogaster. Z.Abstamm. 71, S. 322 (1936).

- TIMOFEEFF-RESS OVSKY, N.W.: Einige Versuche an *Drosophila melanogaster* über die Art der Wirkung der Röntgen-Strahlen auf den Mutationsprozeß. Roux'Arch.Entwmech. 124 (1931).
- " und K.G. ZIMMER.: Biophysik (Band I). Das Trefferprinzip in der Biologie. S.Hirzel Verlag, Leipzig (1947).
- WATSON, J.D. und F.H.C. CRICK.: The Structure of DNA. Cold Spr. Harbor Symp.Quant.Biol. 18, S. 123 (1953).
- " und " : Genetical implications of the structure of DNA. Nature 171, S. 964 (1953).
- WITKIN, E.M.: Nuclear segregation and the delayed appearance of induced mutants in *E.Coli*. Cold Spr. Harbor Symp.Quant. Biol. 16, S. 357-72 (1951).
- ZAMENHOF, S.: Studies on the resistance of DNA'S to physical and chemical factors. Bioch.Biophys.Acta 13, S. 459 (1954).
- " " : Heat as an agent producing mass mutations and unstable genes in *E.coli*. Bacteriol.Proc. 45, (1958).
- " " : Effects of heating dry bacteria and spores on their phenotype and genotype. Proc.Nat.Acad.Sci. 46, S. 101-105 (1960).
- " " : Gene unstabilization induced by heat and nitrous acid. J.Bact. 81, S. 111 bis 117 (1961).

- ZAMENHOF, S; H.E. ALEXANDER und G. LEIDY.: Studies on the chemistry of the transforming activity. I. Resistance to physical and chemical agents. J. Exp. Med. 98, S. 373-97 (1953).
- ZAMENHOF, S; R. De GIOVANNI.: Study of survival of unstable strain of *E. coli*. J. Bact. 75, 514-16 (1958).
- ZAMENHOF, S; S. GREER.: Heat as an agent producing high frequency of mutations and unstable genes in *E. coli*. Nature 182, S. 611-13 (1958).
- ZAMENHOF, S; R. De GIOVANNI.: Abstracts taken from Genetics 47, S. 996 (1962).
- ZETTERBERG, G.: A specific and strong mutagenic effect of N-Nitroso-N-Methylurethan in *Ophiostoma*. Hereditas 47, S. 295 (1961).

L e b e n s l a u f

Am 5. Januar 1941 wurde ich als Sohn des Oberschul-Rektors S.A. Khaliq Ibrahim und seiner Ehefrau Asghari Khaliq Ibrahim in Desna (Indien) geboren. Bereits im Alter von 4 Jahren wurde ich zur Desna-Volksschule geschickt. Im Anschluß daran, von 1949 bis 1956, besuchte ich die N.J.V. Government High School, Karachi, die ich mit dem "Secondary School leaving Certificate" verließ. Von 1956 bis 1960 studierte ich an dem D.J. Government Science College, mit Biologie als Hauptfach und beendete das Studium mit dem "Bachelor of Science-Degree".

Im September 1960 verließ ich meine Heimat, um mich in Mikrobiologie zu spezialisieren. Im November 1960, nach Ablegung der Deutschprüfung, immatrikulierte ich mich an der Universität Frankfurt am Main als ordentlicher Student. Im Mai 1961 wurde ich als Doktorand im Institut für Mikrobiologie aufgenommen. Seitdem bin ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R.W. KAPLAN mit der vorliegenden Arbeit beschäftigt gewesen.

In meinem Heimatland habe ich unter folgenden Professoren oder Dozenten Vorlesungen gehört oder an Praktika teilgenommen:

ANWAR, BEG, CHISHTI, De'SOUZA, GHAZALI, IZHAR, KHALID, MEDORA, NAQUI, OBAID-UR-RAHMAN, RASHID, SAMAD, SAMO, SHAMMIM, SIDHWA, SYIED, ZAIN-UL-ABDIN, ZUBAIRI,

In Deutschland besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der Professoren oder Dozenten:

EGLE, HALBSGUTH, HOFFMANN-BERLING, KAPLAN, MENNIGMANN, LOTZ, PFLEIDERER, PRELL, RAJEWSKY, RIETSCHEL, SAUER, SCHMIDT-THOMÉ, SIEDEL, STAUFF, WIELAND.

